

K_S соответственно от 13 до 2. С учетом этих данных, энергетического спектра уровней РЦ, скоростей их введения и коэффициентов захвата ННЗ на них удалось на основании предложенной модели удовлетворительно описать (качественно и количественно) экспериментально получаемые зависимости $\tau(T)$, $\tau\left(\frac{\Delta n}{n_0}, \frac{\Delta p}{p_0}\right)$, $K_\tau(n_0, p_0)$ [5, 6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Конозенко И. Д., Семенюк А. К., Хиврич В. Т.—Phys. Stat. Sol. 1969, v. 35, N 2, p. 1043.
2. Kholodar G. A., Vinetskii—Phys. Stat. Sol. (a), 1975, v. 30, N 1, p. 47.
3. Curtis O. L., Germano C. A.—IEEE Trans. Nucl. Sci., 1967, v. NS-17, N 6, p. 68.
4. Коноплева Р. Ф., Юферев А. А.—ФТП, 1975, т. 9, № 3, с. 413.
5. Лугаков П. Ф., Ткачев В. Д., Шуша В. В.—ФТП, 1979, т. 13, № 5, с. 875.
6. Лугаков П. Ф., Шуша В. В.—ФТП, 1979, т. 13, № 9, с. 1739.

Поступила в редакцию
29.12.80.

НИИ ПФП

УДК 612.014.1

В. П. ЗОРИН, А. В. ТИМОШЕНКО, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ

ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИОНОВ H^+ В КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЯХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ СПОСОБОМ

Для определения концентрации ионов водорода внутри клеток (pH_i) применяются различные методы [1—7]. Микроэлектродная техника используется обычно при измерении pH_i или изменений этой величины в клетках достаточно больших размеров [2]. Использование спектрофотометрических методов [3] нежелательно вследствие низкой точности измерений. В экспериментах со сравнительно большим числом клеток pH_i можно найти, измеряя распределение ионов слабых кислот и оснований между внутриклеточным и внеклеточным водными объемами [4, 5]. Этот метод требует постоянного контроля за величиной внутриклеточного объема, весьма чувствительного к изменению солевых условий среды. В ряде исследований использованы флуоресцентные методы с применением производных флуоресцеина [6, 7], в частности, ряда конъюгатов изотиоцианата флуоресцеина. Последним способом можно воспользоваться при исследовании процессов в лимфоидных клетках, которые сопровождаются изменением pH_i . В данной работе описывается метод измерения pH_i с помощью ФИТЦ-меченой иммуноглобулиновой сыворотки (ИГ-ФИТЦ).

Материал и методика

Исследовали клетки тимуса самок крыс, иммунизированных сывороточным альбумином человека (срок иммунизации 3—10 дней). Клеточные взвеси получали аналогично методу [8]; pH раствора меняли, используя фосфатный буфер с низкой ионной силой ($\mu=0,02$). Значение pH контролировали с помощью pH -метра « pH -262» (точность 0,01 ед. pH).

Суспензию клеток, к которой добавляли раствор ИГ-ФИТЦ с получением конечной концентрации 0,1 мг/мл, инкубировали при 37 °С, а затем трижды отмывали раствором Хэнкса (центрифугирование 10 мин при 500g). Полученный препарат клеток немедленно использовали для измерений. Концентрация клеток в исследованных образцах $1—3 \cdot 10^6$ кл/мл.

Флуоресцентные характеристики измеряли на установке, описанной ранее [9]. Интенсивность флуоресценции определяли при длине волны $\lambda=520$ нм. Для исследования спектров поглощения применяли спектрофотометр «SPECORD-UV VIS».

Все измерения проведены при комнатной температуре. В работе использованы препараты и реактивы отечественного производства.

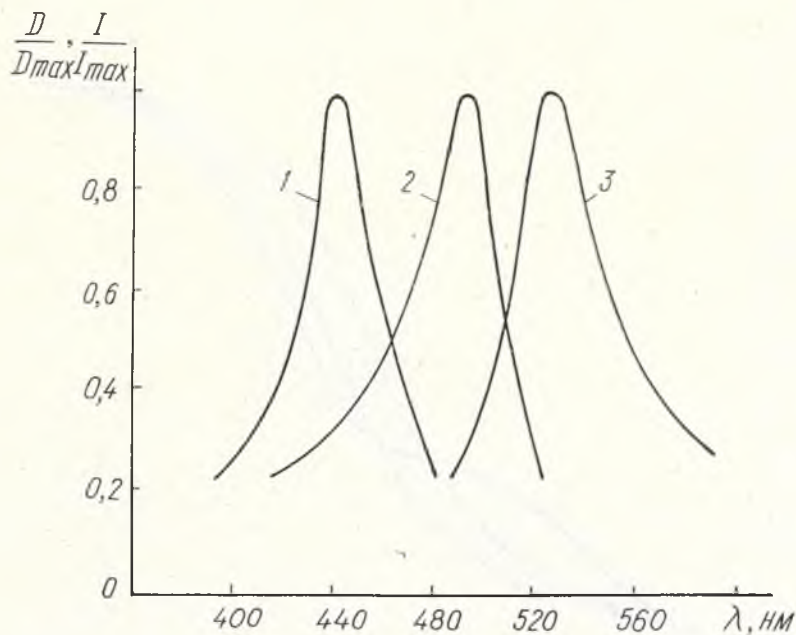


Рис. 1. Спектры поглощения ИГ-ФИТЦ при рН 1,7 (1) и рН 8,0 (2); 3 — спектр флуоресценции ИГ-ФИТЦ при рН 8,0

Результаты и их обсуждение

Спектр поглощения ИГ-ФИТЦ, как видно из рис. 1, зависит от концентрации ионов водорода в растворе. В спектре щелочных растворов преобладает полоса с максимумом при 490 нм, для кислых сред получен спектр с максимумом коротковолновой полосы при 440 нм. Спектр возбуждения при варьировании рН изменяется аналогично спектрам поглощения. Максимум спектра флуоресценции ИГ-ФИТЦ находится при 525 нм. При переходе к кислым средам положение максимума не изменяется, но происходит уширение спектра флуоресценции.

Зависимость спектров поглощения ИГ-ФИТЦ от рН раствора может быть использована для определения концентрации ионов водорода в среде. Отношение n интенсивностей флуоресценции ИГ-ФИТЦ при возбуждении в длинно- и коротковолновой полосах спектра возбуждения является параметром, однозначно определяющим значение рН среды, в которой находятся флуоресцирующие молекулы (рис. 2, кривая 1). Этот параметр практически не зависит от ионной силы раствора (для концентрации NaCl меньше 1 М) и типа буфера. С течением времени наблюдается медленное увеличение интенсивности свечения суспензий клеток (рис. 3). Известно, что в лимфоидных клетках происходит пиноцитоз иммуноглобулинов при участии связывающих их поверхностных рецепторов с последующим образованием новых рецепторов [10]. Процесс пиноцитоза тормозится при низких температурах. Увеличение со временем интенсивности флуоресценции суспензии исследуемых клеток при инкубировании их с ИГ-ФИТЦ можно объяснить накоплением зонда в клетке. При низких температурах инкубирования (0—4 °С) интенсивность флуоресценции суспензий практически не изменяется со временем, что подтверждает предположение о пиноцитозе ИГ-ФИТЦ внутрь клеток при более высоких температурах.

Изменение интенсивности флуоресценции во времени носит линейный характер, что указывает на способность клеток к пиноцитозу с постоянной скоростью в течение относительно большого промежутка времени.

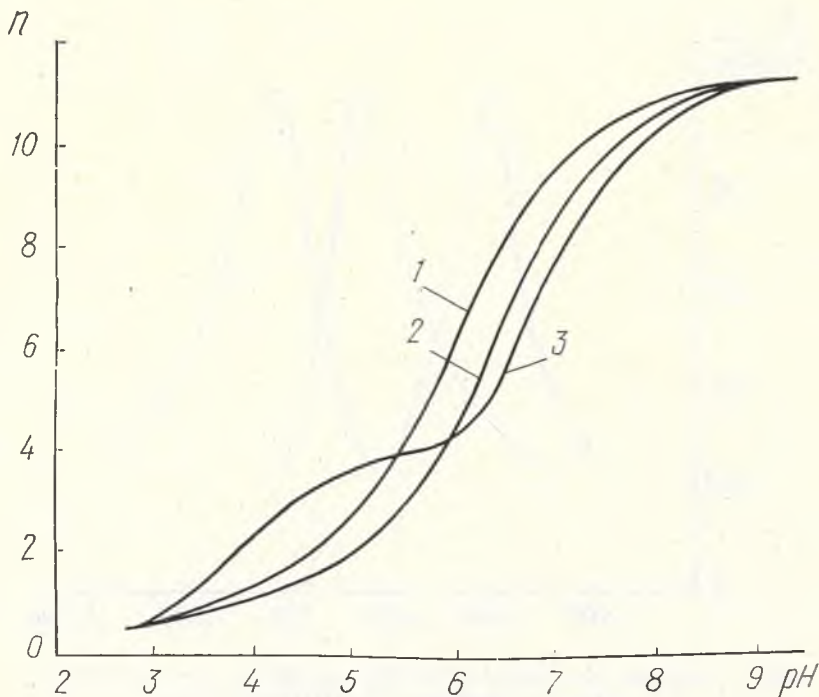


Рис. 2. Зависимость параметра n от рН для фосфатного буфера (1), для суспензий лимфоцитов, инкубированных совместно с ИГ-ФИТЦ в течение 30 мин (2) и 4 ч (3)

На рис. 2 показана зависимость параметра n ($n = \frac{\lambda_{\text{ВОЗБ}} 485}{\lambda_{\text{ВОЗБ}} 435}$) от рН раствора для клеток, инкубированных в течение 30 мин (кривая 2) и 4 ч (кривая 3). Кривая 2 по отношению к калибровочной кривой 1 в целом смещена вправо на 0,40—0,45 единицы рН. При низких значениях рН кривая 3 идет выше калибровочной и пересекает ее при значениях рН 5,5—5,7. Этот факт характеризует обусловленную наличием клеток неоднородность распределения ионов H^+ в среде. При рН ниже 3 и выше 9 ход кривых 2 и 3 почти совпадает с ходом кривой 1. Очевидно, при этих значениях рН происходит разрушение клеточных структур, приводящее к исчезновению существующей в исходных препаратах неравномерности распределения ионов H^+ в растворе и клетках.

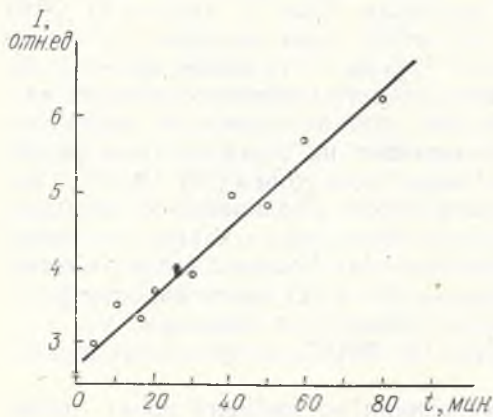


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции ИГ-ФИТЦ от времени его инкубирования в суспензии клеток

Представленные результаты показывают возможность использования ИГ-ФИТЦ в качестве рН-зонда при исследовании клеток лимфоидной ткани. Однако необходимо считаться с возможностью различной локализации молекул ИГ-ФИТЦ в клетке.

Часть молекул находится у поверхности клеток, часть — в клетке. Вследствие неодинаковой локализации макромолекул, несущих флуоресцентную метку, относительно буферного барьера клетки — ее поверхностной мем-

браны, их реакция на изменение рН среды будет различна (см. рис. 2). Наличие значительного электрического заряда на поверхности клетки и электрического поля, создаваемого им, обуславливает неоднородное распределение ионов в растворе [11], в том числе и ионов водорода. Разность электростатических потенциалов между поверхностью клетки и средой должна быть скомпенсирована разностью химического потенциала. Связь между величиной электростатического потенциала Ψ и градиентом концентрации ионов H^+ (ΔpH) в растворе определяется соотношением $\Delta pH = \frac{e}{2,3 kT} \cdot \Psi$, где k — постоянная Больцмана; T — температура, K ; e — элементарный заряд.

При малых временах инкубирования клеток в растворе с ИГ-ФИТЦ наибольший вклад в интенсивность флуоресценции будут вносить молекулы зонда, локализованные на поверхности клеток. При этом величина ΔpH равна 0,40—0,45 и постоянна в широкой области изменений рН раствора. Полученное значение ΔpH соответствует Ψ 24—27 мВ.

При длительном инкубировании клеток флуоресценция обусловлена хромофорами ФИТЦ, находящегося в клетке. В этом случае ход зависимости n от рН является характерным для буферной системы. Известно, что в физиологической среде клетки обладают значительной буферной емкостью. Тем не менее, величина pH_i зависит от рН и буферных свойств внешней среды [7], а также от присутствия ряда химических агентов [12]. Анализ причин зависимости pH_i от рН для лимфоидных клеток в настоящее время преждевременен до окончательного выяснения природы мест локализации зонда в клетке. Отметим, что полученные результаты позволяют оценить для лимфоцитов тимуса при физиологически умеренных значениях рН внешней среды величину pH_i , равную 5,5—5,7. Столь низкое значение pH_i может быть связано с тем, что определенная часть красителя находится внутри клеточных лизосом [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Sheldon Adler, Fraley Donald S.—Kidney Int., 1977, v. 11, № 6, p. 433.
2. Сорокина З. А.—Цитология, 1961, т. 3, № 1, с. 48.
3. Литинская Л. Л., Векслер А. М. и др.—Stud. biophys., 1979, v. 77, № 1, p. 69.
4. Hinke J. A., Menard M. R.—Respirat. Physiol., 1978, v. 33, № 1, p. 31.
5. Garcia Sancho J., Sanchez A.—Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 509, № 1, p. 148.
6. Ohkuma Shoji, Brian Poole.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 7, p. 3327.
7. Visser J. M. H., Jongeling A. A. M., Tanke H. J.—J. Histochem. and Cytochem., 1979, v. 27, № 1, p. 32.
8. Зорин В. П., Левин В. И. и др.—Материалы III Всесоюзной конференции по химиотерапии злокачественных опухолей. Минск, 1977, с. 121.
9. Перцев А. Н., Писаревский А. И. и др.—ЖПС, 1964, т. 1, № 4, с. 303.
10. Darvin Scott L.—Acta histochem., 1978, v. 61, № 2, p. 204.
11. Харамоненко С. С., Ракитянская А. А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии.—Минск, 1974, с. 5.
12. Сорокина З. А.—Цитология, 1976, т. 18, № 7, с. 783.

Поступила в редакцию
26.02.81.

Кафедра биэлектрики